

Внутриклеточный метаболизм нейтрофилов и риск развития сахарного диабета 2 типа у больных с метаболическим синдромом

Кратнов А.Е., Лопатникова Е.Н., Кратнов А.А.

ГБОУ ВПО Ярославская государственная медицинская академия, Ярославль
(ректор – проф. А.В. Павлов)

У 77 мужчин (средний возраст $47 \pm 7,4$ года) без ишемической болезни сердца были изучены факторы метаболического синдрома, риск развития сахарного диабета 2 типа (СД2) по тесту-опроснику “FINDRISK” и параметры внутриклеточного метаболизма нейтрофилов. Увеличение риска развития СД2 у пациентов с метаболическим синдромом сопровождалось ростом активности миелопероксидазы и содержания пероксида водорода в нейтрофилах, а также увеличением индекса массы тела. У пациентов с выраженным ожирением III степени рост кислородзависимого метаболизма нейтрофилов наблюдался на фоне снижения антиоксидантной защиты в фагоцитах, что может способствовать развитию окислительного стресса.

Ключевые слова: метаболический синдром, сахарный диабет 2 типа, нейтрофилы, свободные формы кислорода, антиоксиданты

Intracellular metabolism of neutrophils and risk for development of type 2 diabetes mellitus in patients with metabolic syndrome

Kratnov A.E., Lopatnikova E.N., Kratnov A.A.

Yaroslavl State Medical Academy, Yaroslavl, Russian Federation

77 male patients (mean age 47 ± 7.4 years) without ischaemic heart disease were tested for metabolic syndrome factors, risk for development of type 2 diabetes mellitus (T2DM) according to “FINDRISK” questionnaire, following with assessment of intracellular metabolism parameters of neutrophils. Increased risk for T2DM positively correlated in these patients with myeloperoxidase activity, level of hydrogen peroxide within neutrophils and BMI. We observed elevation of oxygen-dependent metabolism in neutrophils form patients with morbid obesity, accompanied with decrease in antioxidant factors, which is suggestive of oxidative stress.

Key words: metabolic syndrome, diabetes mellitus type 2, neutrophils, reactive oxygen species, antioxidants

В последние годы распространение метаболического синдрома, наличие которого сопровождается увеличением риска развития сахарного диабета 2 типа (СД2) и сердечно-сосудистых заболеваний, приняло характер эпидемии [1]. Существуют данные, что метаболический синдром сопровождается воспалением жировой ткани, которое проявляется ее клеточной инфильтрацией и изменением секреции адипокинов. Полагают, что один из адипокинов – лептин активизирует нейтрофилы (НФ) и макрофаги, стимулируя в них секрецию цитокинов, усиливает экспрессию молекул адгезии, способствует развитию окислительного стресса [2].

Целью исследования было изучение внутриклеточного метаболизма НФ у лиц с метаболическим синдромом без ишемической болезни сердца (ИБС) в зависимости от риска развития СД.

Материалы и методы

Обследовано 77 мужчин в возрасте от 29 до 61 года (средний возраст $47 \pm 7,4$ года). Для исключения ИБС всем пациентам выполнялась электрокардиография

(ЭКГ), велоэргометрия, холтеровское мониторирование ЭКГ, эхокардиография. С целью диагностики метаболического синдрома использовались критерии экспертов Международной федерации диабета при участии Американского национального института сердца, легких и крови (2009) [3]. Пациенты с СД исключались из исследования. Метаболический синдром был выявлен у 62 (80,5%) обследованных пациентов. У лиц с метаболическим синдромом 10-летний риск развития СД оценивался по тесту-опроснику “FINDRISK” экспертов общества эндокринологов Финляндии. Высокий 10-летний риск развития СД (общее количество баллов ≥ 15) наблюдался у 31 (50%) пациента с метаболическим синдромом. Для диагностики степени общего ожирения рассчитывался индекс массы тела (ИМТ). Ожирение встречалось у 59 (76,6%) обследованных пациентов, из них у 38 (64,4%) выявлялась I степень ожирения (ИМТ $30-34,9$ кг/м²), у 15 (25,4%) – II степень ожирения (ИМТ $35-39,9$ кг/м²), у 6 (10,2%) пациентов – III степень ожирения (ИМТ ≥ 40 кг/м²).

Материалом для исследования являлась периферическая кровь, анализ которой осуществляли при поступлении больных в стационар. НФ выделяли

из гепаринизированной крови в двойном градиенте плотности фикола-верографина 1,077 и 1,092 г/мл. Для исследования брали клетки второй интерфазы, которую составляли НФ на 95%. Количество НФ в клеточной суспензии подсчитывали в камере Горяева с использованием прижизненной окраски раствором метиленового синего в 3% уксусной кислоте (краска Тюрка) для определения жизнеспособных клеток. Жизнеспособность фагоцитов, оцениваемая по трипановому тесту, составляла более 90%. Для достижения концентрации 5×10^6 НФ в 1 мл клеточную суспензию разводили средой 199.

Для изучения активности НАД(Ф)Н-оксидазы в НФ использовался тест спонтанного и стимулированного восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест), который проводили количественным спектрофотометрическим методом по Т.А. Gentle и R.A. Thompson с использованием 0,2% раствора нитросинего тетразолия на фосфатном буфере с pH 7,2, фиксацией клеток метанолом и растворением восстановленного диформаза в смеси 2М калия гидроксида и диметилсульфоксида 3:5 по объему [4].

Активность миелопероксидазы изучали с использованием 0,04% раствора ортофенилендиамина на фосфатном буфере с pH 5,0 с добавлением 0,33% раствора перекиси водорода в соотношении 20:1 по объему. Реакцию останавливали через 10 минут 10% раствором серной кислоты. Бланкировка проходила по раствору ортофенилендиамина и серной кислоты в тех же соотношениях, но без клеточного лизата. Фотометрию проводили при $\lambda=492$ нм. Калибровочные растворы изготавливались разведением стандартной пероксидазы хрена ("Sigma Chemical", США) в фосфатном буфере с pH 5,0 от 0,1 до 100 Ед Sigma/мл [5].

Определение пероксида водорода в НФ проводилось количественным спектрофотометрическим методом по A. Pick и Y. Keisari с использованием 0,2% раствора фенолового красного. Метод основан на способности перекиси водорода взаимодействовать с феноловым красным с образованием неидентифицированного продукта. После инкубации в течение 60 минут при темпе-

ратуре 37°C реакцию останавливали добавлением 1М раствором NaOH. Интенсивность окраски измеряли при $\lambda=600$ нм против контрольной пробы, в которой реакция была остановлена сразу после добавления красителя [6].

Определение активности каталазы в НФ основывалось на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс. Реакцию запускали добавлением 0,03% раствора перекиси водорода. В холостую пробу вместо лизата НФ вносили дистиллированную воду. Реакцию останавливали через 10 минут добавлением 4% раствора молибдата аммония. Интенсивность окраски измеряли при $\lambda=410$ нм против контрольной пробы с дистиллированной водой [7].

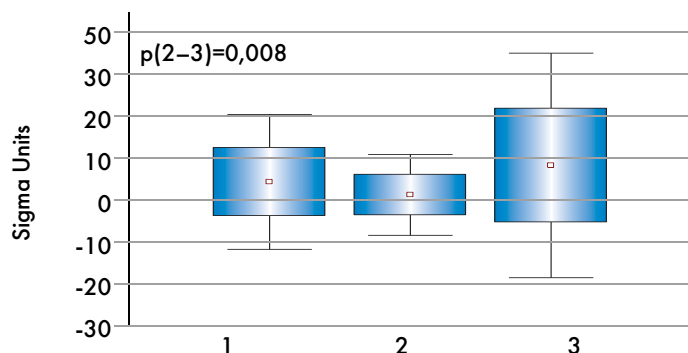
Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Статистическую обработку данных проводили с помощью параметрических и непараметрических методов, используя пакет Statistica 5.5 (StatSoft, Inc., USA). Данные исследований представлены в виде их средних значений и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

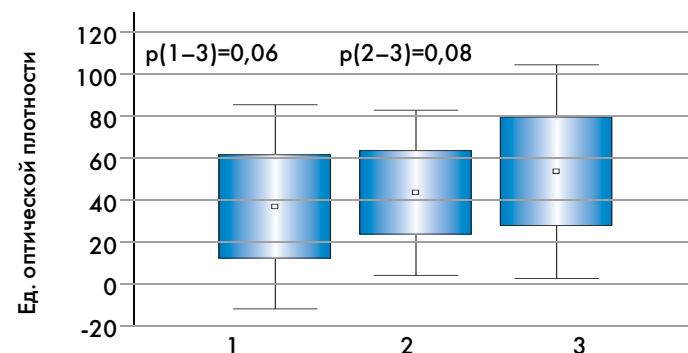
Пациенты с высоким 10-летним риском развития СД, по сравнению с остальными лицами с метаболическим синдромом, были достоверно старше ($49,3 \pm 8 > 44,5 \pm 6,1$ года; $p=0,01$) и имели более высокий уровень глюкозы капиллярной крови ($5,6 \pm 0,5 > 4,7 \pm 0,4$ ммоль/л; $p=0,0001$). При изучении внутриклеточного метаболизма НФ выявлено, что у данных пациентов были выше активность миелопероксидазы ($13,8 \pm 15,5 > 5,8 \pm 5,5$ Sigma Units; $p=0,008$) и содержание пероксида водорода ($52,7 \pm 24,2 > 45,8 \pm 22,5$ единиц оптической плотности; $p=0,08$) в фагоцитах (см. рис. 1 и 2). Также у пациентов с высоким риском развития СД был выше ИМТ ($34,5 \pm 5,1 > 32,5 \pm 3,9$ кг/м²; $p=0,09$).

Изучение внутриклеточного метаболизма НФ при метаболическом синдроме позволило обнару-



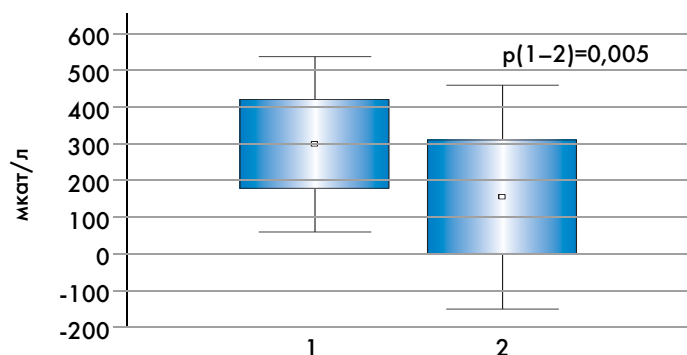
(1) – пациенты без метаболического синдрома;
(2) – пациенты с метаболическим синдромом (количество баллов по тесту-опроснику "FINDRISK" <15);
(3) – пациенты с метаболическим синдромом (количество баллов по тесту-опроснику "FINDRISK" ≥15).

Рис. 1. Активность миелопероксидазы в НФ у обследованных пациентов



(1) – пациенты без метаболического синдрома;
(2) – пациенты с метаболическим синдромом (количество баллов по тесту-опроснику "FINDRISK" <15);
(3) – пациенты с метаболическим синдромом (количество баллов по тесту-опроснику "FINDRISK" ≥15).

Рис. 2. Содержание пероксида водорода в НФ у обследованных пациентов



(1) – пациенты с ИМТ <40 кг/м²;
(2) – пациенты с ИМТ ≥40 кг/м².

Рис. 3. Активность каталазы в нейтрофилах у обследованных пациентов

жить, что его изменения обусловлены наличием у пациентов общего ожирения. У пациентов с ожирением III степени, по сравнению с другими лицами, наблюдалось увеличение активности миелопероксидазы ($13,7 \pm 10,5 > 9,1 \pm 11,5$ Sigma Units) и содержание пероксида водорода ($50,1 \pm 22,9 > 46,7 \pm 23,9$ единиц оптической плотности) в НФ. Рост кислородзависимого метаболизма НФ у пациентов с выраженным ожирением (см. рис. 3) сопровождался достоверным снижением внутриклеточной активности каталазы ($156,9 \pm 155,1 < 304,2 \pm 119,8$ мкат/л; $p=0,005$). У пациентов с высоким риском развития СД между индексом массы тела и активностью каталазы в НФ выявлялась достоверная отрицательная корреляция ($r=-0,54$; $p<0,05$).

Главным аргументом повышенного интереса к метаболическому синдрому, одним из критериев которого считается ожирение, является его связь с атеросклерозом и риском развития сердечно-сосудистых заболеваний. Выявлено, что ожирение и гипергликемия коррелируют с патологоанатомическими находками атеросклеротических бляшек в коронарных артериях и брюшной аорте у молодых людей в возрасте 15–34 лет [8]. Показано, что наличие метаболического синдрома сопровождается ростом уровня в крови провоспалительных цитокинов, образующихся, вероятно, в жировой ткани и стимулирующих образование С-реактивного белка, рост содержания которого увеличивает риск появления ИБС. При этом известно, что С-реактивный белок усиливает подвижность лейкоцитов, инициирует фагоцитоз и связывание комплемента, стимулирует экспрессию молекул адгезии на поверхности эндотелия [9, 10]. В последние годы показана важная роль актив-

ных форм кислорода в развитии осложнений и появлении сердечно-сосудистых событий у больных СД [11]. Ранее доказана связь активации кислородзависимого метаболизма НФ с развитием неблагоприятного исхода у больных ИБС [12].

В данном исследовании выявлено, что увеличение риска развития СД у пациентов с метаболическим синдромом сопровождается ростом кислородзависимого метаболизма НФ, активация которого ассоциируется с ожирением. Обнаружено, что у пациентов с высоким 10-летним риском развития СД увеличивается в НФ активность миелопероксидазы и содержание пероксида водорода, которые способны к образованию фермент-субстратного комплекса. Наиболее цитотоксичными продуктами системы миелопероксидазы являются гипохлорная кислота и гипохлорит-анион, которым принадлежит основная антимикробная функция НФ. Пероксид водорода и гипохлорная кислота, хотя и не являются свободными радикалами, способны разлагаться с образованием реакционноспособного гидроксил-радикала, являющегося основным повреждающим агентом в биологических системах [13].

Выявлено, что повышенный отдаленный сердечно-сосудистый риск, как и риск смерти от всех причин, отмечается в основном в случаях выраженного ожирения [14]. В настоящем исследовании у пациентов с ожирением III степени рост содержания пероксида водорода в НФ наблюдался на фоне значительного снижения внутриклеточной активности антиоксидантной защиты. Ранее показано, что уменьшение антиоксидантной защиты в НФ сопровождается увеличением риска наступления летального исхода при ИБС [15]. Можно полагать, что «провоспалительное» состояние, наблюдаемое при метаболическом синдроме, обладает способностью провоцировать нестабильность атеросклеротической бляшки и тем самым предрасполагать к развитию сердечно-сосудистых событий.

Заключение

Увеличение риска развития СД у пациентов с метаболическим синдромом сопровождается ростом кислородзависимого метаболизма НФ, активация которого на фоне снижения антиоксидантной защиты в фагоцитах ассоциирована с ожирением.

Авторы декларируют отсутствие двойственности (конфликта) интересов связанных с рукописью.

Литература

1. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsén B, Lahti K, Nissén M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001 Apr;24(4):683–689.
2. Шварц В. Воспаление жировой ткани и атеросклероз. *Кардиология*. 2009; 12:80–86.
3. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr; Inter-

national Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Fed-

- eration; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009 Oct 20;120(16):1640–1645. Epub 2009 Oct 5.
4. Gentle TA, Thompson RA. Neutrophil function tests in clinical immunology. In: Gooi HG, Chapel H. *Clinical immunology. A practical approach*. (2nd ed.). New York: Oxford University Press; 1990. P. 57–59.
 5. Саидов МЗ, Пинегин БВ. Спектрофотометрический способ определения активности миелопероксидазы в фагоцитирующих клетках. *Лабораторное дело*. 1991; (3):56–59.
 6. Pick A, Keisari Y. Superoxide anion and hydrogen peroxide production by chemically elicited peritoneal macrophages. *Cell Immunol*. 1981 Apr;59(2):301–318.
 7. Мамонтова НС, Белобородова ЭИ, Тюкалова ЛИ. Активность каталазы при хроническом алкоголизме. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1994; (1):27–28.
 8. Strong JP, Malcom GT, McMahan CA, Tracy RE, Newman WP 3d, Herderick EE, Cornhill JF. Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults: implications for prevention from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Study. *JAMA*. 1999 Feb 24;281(8):727–735.
 9. Ridker PM, Wilson PW, Grundy SM. Should C-reactive protein be added to metabolic syndrome and to assessment of global cardiovascular risk? *Circulation*. 2004 Jun 15;109(23):2818–2825.
 10. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation*. 2003 Jan 28;107(3):391–397.
 11. Ziegler D, Sohr CG, Nourooz-Zadeh J. Oxidative stress and antioxidant defense in relation to the severity of diabetic polyneuropathy and autonomic neuropathy. *Diabetes Care*. 2004 Sep;27(9):2178–2183.
 12. Кратнов АЕ. Состояние кислородзависимого метаболизма фагоцитов и антиоксидантной защиты плазмы крови при острых коронарных синдромах в зависимости от исхода в период госпитализации. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2002; (6):6–13.
 13. Babior BM. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood*. 1984 Nov;64(5):959–966.
 14. Romero-Corral A, Montori VM, Somers VK, Korinek J, Thomas RJ, Allison TG, Mookadam F, Lopez-Jimenez F. Association of bodyweight with total mortality and with cardiovascular events in coronary artery disease: a systematic review of cohort studies. *Lancet*. 2006 Aug 19;368(9536):666–678.
 15. Кратнов АЕ, Хабарова ИВ. Изменения внутриклеточного метаболизма нейтрофилов и смертельный исход при ишемической болезни сердца. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2009; (1):20–21.

Кратнов Андрей Евгеньевич

д.м.н., проф., зав. кафедрой терапии педиатрического факультета, ГБОУ ВПО Ярославская государственная медицинская академия, Ярославль

E-mail: kratnov@mail.ru

Лопатникова Елена Николаевна

к.м.н., доцент кафедры терапии педиатрического факультета, ГБОУ ВПО Ярославская государственная медицинская академия, Ярославль

Кратнов Александр Андреевич

аспирант кафедры терапии педиатрического факультета, ГБОУ ВПО Ярославская государственная медицинская академия, Ярославль